

Contrôle des extraits de pollen au moyen d'enzymes

J. BOUSQUET *, B. GUÉRIN ** et F. B. MICHEL

Les enzymes représentent une grande partie des protéines libérées par les pollens lorsqu'ils sont mis en suspension dans l'eau (STANLEY et LISKENS). Bien que leur connaissance soit ancienne, les enzymes polliniques avaient surtout été étudiées par les palynologues et les physiologistes.

De nombreuses enzymes ont été mises en évidence dans les pollens allergisants (BOUSQUET et coll. [3]) et le rôle des enzymes dans le contrôle des extraits de pollens destinés à l'Allergologie a été suspecté (BOUSQUET et coll. [2]). En réalité, les études enzymatiques ont été surtout appliquées à la détermination de la puissance allergénique d'un extrait, ainsi qu'à la recherche de contaminants.

ENZYMES PRÉSENTÉES DANS LES ALLERGÈNES PURIFIÉS

MATÉRIELS ET MÉTHODES

Trois allergènes purifiés de short ragweed (antigènes E, K et Ra 3) et trois allergènes purifiés d'ivraie (rye grass groups I, II et III) ont été gracieusement donnés par le docteur H. BAER. Ils ont été testés avant et après ébullition.

55 activités enzymatiques ont été recherchées au moyen d'une microméthode, le système Api-Zym (La Balme les Grottes, Montalieu - Vercieu) [2, 3, 4, 5].

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Seuls deux antigènes purifiés présentent une activité enzymatique. Une activité de phosphatase acide a été notée pour les antigènes E et rye grass group I. Les extraits bouillis n'avaient plus d'activité enzymatique. Le dosage de la phosphatase acide au moyen de la technique spectrophotométrique de ANDERSCH et coll. [1] (Laboratoires Boehringer Mannheim GmbH) a confirmé les résultats obtenus avec la gamme Api-Zym et a montré qu'il existait 60 mUI/mg d'antigène E et 25 mUI/mg d'antigène rye grass groupe I.

Ce dernier possède aussi une activité lipasique mais elle persiste après ébullition de l'antigène. Il semble donc qu'il s'agisse d'une activité non spécifique.

La présence d'enzymes au sein des allergènes purifiés a une double signification. Il s'agit soit d'impuretés ayant une activité enzymatique soit d'une activité enzymatique de l'antigène purifié. Le fait que seuls deux des six antigènes testés aient une activité phosphatasique semble éliminer le rôle des impuretés.

COMPARAISON DE LA PUISSANCE ALLERGÉNIQUE D'UN EXTRAIT DE POLLEN AVEC LES DOSAGES ENZYMATIQUES

MATÉRIELS ET MÉTHODES

Trois espèces polliniques ont été étudiées : la dactyle (*Dactylis glomerata*), l'ivraie (*Lolium perenne*) et le short ragweed (*Ambrosia eliator*). Cinq extraits commerciaux et un extrait de référence ont été examinés pour chaque espèce (tableau I).

La puissance allergénique a été mesurée au moyen du RAST-inhibition selon la technique de GLEICH et coll. [7]. Deux dosages enzymatiques colorimétriques ont été réalisés : la phosphatase acide selon la méthode de ANDERSCH et coll. [1] et la leucine aminopeptidase (LAP) selon la méthode de NAGEL et coll. [9]. Les réactifs sont sous la forme de Kits prêts à l'emploi commercialisés par les Laboratoires Boehringer Mannheim GmbH.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

L'activité allergénique des extraits était très variable car la quantité d'extrait nécessaire à inhiber l'activité du RAST de 50 p. cent était de 0,5 µl à 10 µl. Les variations étaient retrouvées pour l'activité enzymatique, la phosphatase acide ayant des valeurs comprises entre 10 mUI/ml et 10 000 mUI/ml, et la LAP de 1 mUI/ml à 340 mUI/ml.

(*) CHU, Hôpital l'Aiguelongue, Montpellier.

(**) Laboratoire des Stallergènes, Joinville-le-Pont.

Tirés à part : J. BOUSQUET, CHU, Hôpital l'Aiguelongue, avenue du Major Flandre, 34059 MONTPELLIER CEDEX (France).

TABLEAU I
EXTRAITS TESTÉS

	LABORA- TOIRE	PUISSANCE	CONSER- VATEUR	REMAR- QUES
Dactyle	Dome	5 000 PNU	glycérine	
	Bencard	2,5 %	glycérine	
	Stallergènes	5 %	glycérine	
	Greer	5 %	glycérine	
	Greer	5 %	lyophilisé	
	NIBSC	10 %	lyophilisé	dialysé
Ivraie	Dome	5 000 PNU	glycérine	
	Bencard	2,5 %	glycérine	
	Stallergènes	5 %	glycérine	
	Greer	5 %	glycérine	
	Greer	5 %	lyophilisé	
	BOB	10 %	lyophilisé	
Short ragweed	Pasteur	1 %	salin	
	Bencard	2,5 %	glycérine	
	Stallergènes	5 %	glycérine	
	Greer	5 %	glycérine	
	Greer	5 %	lyophilisé	
	BOB	10 %	lyophilisé	

La corrélation entre activités allergéniques et enzymatiques a été effectuée au moyen d'un programme informatique Harwell explorant la régression multiple.

Pour les extraits de dactyle aucune corrélation ne fut observée peut-être parce que l'extrait le plus concentré était dialysé. Nous avons alors réalisé la dialyse d'un extrait de dactyle pendant quatre heures contre de l'eau et à travers une membrane laissant passer les molécules de moins de 2 500 daltons. Cette opération entraîne une perte de 80 p. cent de l'activité enzymatique et allergénique.

Pour ce qui concerne les extraits d'ivraie, il existe une bonne corrélation entre le dosage de la phosphatase acide et l'activité allergénique ($p < 0,01$) (fig. 1). Par contre aucune corrélation n'existe avec la LAP, peut-être parce que les taux de LAP sont trop faibles.

Par contre, pour les extraits de short ragweed, on note une corrélation significative entre les deux dosages enzymatiques et l'activité allergénique ($p < 0,01$) (fig. 1).

CONCLUSIONS

Malgré le faible nombre d'extraits testés, nous avons observé une corrélation significative entre les activités enzymatiques et allergéniques de certains extraits de pollen. Pour la dactyle aucune corrélation n'a pu être mise en évidence peut-être parce que les enzymes choisies ne sont pas correctes ou parce que l'extrait le plus concentré était dialysé, ou parce que les dosages enzymatiques ne peuvent pas être appliqués à cette espèce de pollen. Pour

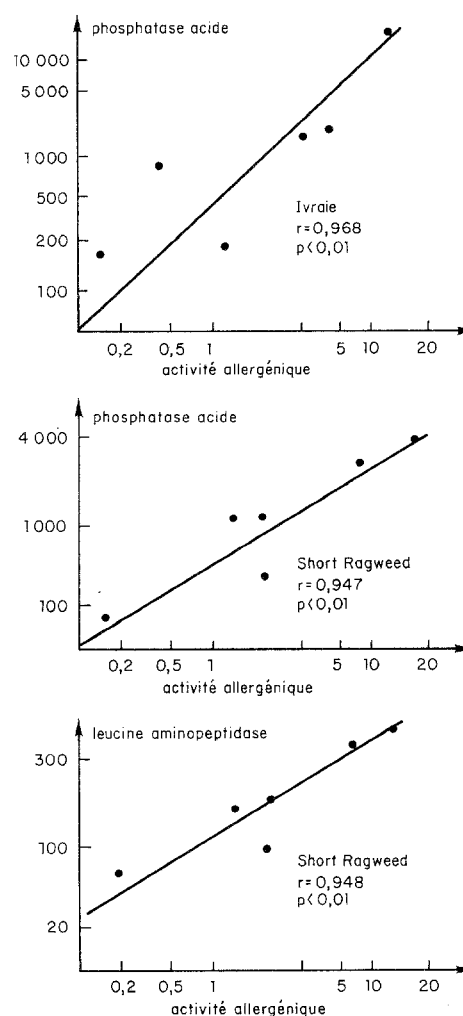


FIG. 1. — Comparaison de l'activité allergénique mesurée par la technique du RAST. Inhibition avec les dosages enzymatiques exprimés en mUI/ml.

l'ivraie, le dosage de phosphatase acide semble corréler l'activité allergénique et nous avons aussi observé que l'antigène Rye grass group I avait une activité de phosphatase acide. Enfin, pour le short ragweed, phosphatase acide et LAP corrélaient l'activité allergénique, et l'antigène E a une activité de phosphatase acide.

En fait, les études réalisées ne portent que sur six extraits de chaque espèce et les résultats hautement significatifs peuvent être plus apparents que réels.

RECHERCHE DE CONTAMINANTS DANS UN EXTRAIT DE POLLEN

Les extraits de pollen contiennent un grand nombre d'hydrolases en quantité souvent abondante, mais certaines enzymes sont toujours absentes dans les extraits obtenus avec des pollens parfaitement purs. Trois activités glucidasiques n'ont jamais été

détectées en utilisant la gamme Api-Zym : il s'agit de l' α et β -glucosidase et de la β -glucuronidase. Nous avons donc focalisé la recherche de contaminants non polliniques au moyen de ces trois activités glucidasiques.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

Deux contaminants majeurs existent au sein des matières premières polliniques à cause du mode d'obtention des pollens. Il s'agit des débris végétaux non polliniques (inflorescences et feuilles) et des moisissures. Nous avons donc examiné des fleurs, des fleurs moisies, des pollens purs et si possible contaminés provenant de la même espèce. Nous avons testé trois moisissures : *Alternaria tenuis*, *Aspergillus niger* et *Hormodendrum hordei*. Les extraits de pollens que nous avons réalisés ont été comparés à des extraits commerciaux provenant si possible de plusieurs laboratoires (Stallergènes, Dome, Bencard, Hollister-Stier, Greer et Pharmacia).

Les études enzymatiques ont été effectuées au moyen de la gamme Api-Zym. Les trois activités enzymatiques particulièrement examinées étaient l' α -glucosidase (substrat : 2-naphtyl- α -D-glycopyranoside), la β -glucosidase (substrat : 6-Br-2-naphtyl- β -D-glycopyranoside) et la β -glucuronidase (substrat : naphthol-A5-BI-D-acide glucuronique).

RÉSULTATS

Ils sont indiqués dans les tableaux II et III. En ce qui concerne les extraits que nous avons préparés nous-mêmes, nous n'avons jamais observé d'activité glucuronidasique ou glucosidasique au sein des pollens purs. Nous avons testé actuellement plus de

TABLEAU II

COMPARAISON DE L'ACTIVITÉ ENZYMATIQUE
DES EXTRAITS DE POLLENS ET DE FLEURS

ESPÈCE	EXTRAIT TESTÉ	α -GLUCOSIDASE	β -GLUCOSIDASE	β -GLUCURONIDASE
Dactyle	Pollen pur	0	0	0
	Fleur	0	+++	0
	Fleur moisie	+	+++	+++
Phléole	Pollen pur	0	0	0
	Fleur	+	+++	0
	Fleur moisie	+++	+++	0
Pissenlit	Pollen pur	0	0	0
	Fleur	0	++	0
	Fleur moisie	+	+++	0
Trèfle	Pollen pur	0	0	0
	Pollen contaminé	0	++	0
	Fleur	0	++	0
	Fleur moisie	+	++++	0
Armoise	Pollen pur	0	0	0
	Pollen contaminé	0	++	0
	Fleur	0	+++	0
Plantain	Pollen pur	0	0	0
	Fleur	0	++	0
	Fleur moisie	+	+++	0

TABLEAU III

ACTIVITÉ DE LA β -GLUCOSIDASE DANS LES DIVERS EXTRAITS DE POLLEN

ESPÈCES DE POLLENS	POURCENTAGE DE CONTAMINATION D'UN EXTRAIT DE POLLEN NATUREL * (p. cent)	ACTIVITÉ ENZYMATIQUE DES EXTRAITS DE POLLEN	
		NATUREL	DU COMMERCE
Chiendent (<i>Agropyron repens</i>)	0	0	0
Dactyle (<i>Dactylis glomerata</i>)	0	0	0
Armoise (<i>Artemisia vulgaris</i>)	10	+	0
Pissenlit (<i>Taraxacum officinale</i>)	0	0	0
Solidage (<i>Solidago speciosa</i>)	0	0	0
Pariétaire (<i>Parietaria officinalis</i>)	20	++	+ à +++
Trèfle (<i>Trifolium pratense</i>)	30	+++	+
Cyprès (<i>Cupressus sempervirens</i>)	0	0	0
Murier du Japon (<i>Broussonetia papyrifera</i>)	0	0	+++
Troène (<i>Ligustrum vulgare</i>)	0	0	0

* Les extraits de pollens « naturels » sont ceux préparés par nos soins.

60 espèces récoltées souvent sur plusieurs années. La β -glucosidase et à un degré moindre l' α -glucosidase sont présentes dans la plupart des extraits de fleurs séchées que nous avons préparés, en particulier chez les graminées et les composées. Par contre les fleurs d'ombellifères, d'oléacées et du plantain semblent avoir une activité glucosidasique faible, peut-être à cause d'un défaut d'extraction. Les fleurs moisies ont des activités glucosidasiques toujours présentes et élevées et dans certains cas on trouve des activités β -glucuronidase.

Les trois moisissures testées ont une forte activité β -glucosidase et *Alternaria tenuis* a en outre une activité β -glucuronidase.

La comparaison des extraits de pollens que nous avons réalisée avec les extraits commerciaux de même espèce montre une bonne concordance pour les graminées (sauf pour un lot de fétuque qui semble contaminé). Les résultats observés chez les composées sont plus variables. Les extraits de pollens d'herbacées telles que trèfle, pariétaire, ortie, sont le plus souvent contaminés. Enfin des résultats variables ont été observés pour les arbres.

DISCUSSION

La présence d'activité β ou α -glucosidase ou β -glucuronidase en utilisant les substrats indiqués, semble prouver que l'extrait de pollen est contaminé. Deux contaminants majeurs des matières premières polliniques possèdent de telles activités enzymatiques.

Quelques restrictions doivent être apportées.

— En utilisant d'autres substrats, les activités glucidasiques absentes peuvent théoriquement être trouvées dans les pollens. Cependant, nous cherchons une méthode de contrôle et non la caractérisation exacte des enzymes des pollens.

— Certaines inflorescences semblent posséder moins de β -glucosidase que d'autres, ce qui rend la généralisation du test impossible. Il faudrait tester toutes les espèces.

— On ne peut pas facilement séparer à l'aide de ces trois activités enzymatiques les inflorescences des moisissures, il est vraisemblable que l'étude d'activités supplémentaires pourra trancher [4]. D'autres contaminants peuvent présenter de telles activités glucidasiques, mais en fait le problème essentiel est de savoir qu'un extrait de pollen est contaminé.

La recherche de la contamination d'un extrait de pollen n'est pas simplement académique mais elle débouche sur des problèmes pratiques. L'injection d'allergènes dans le but d'une désensibilisation spécifique peut induire des sensibilisations nouvelles si

l'extrait injecté contient des allergènes nouveaux pour le sujet (GREENERT et coll. [8]). D'autre part l'allergie au jus extrait de feuilles de graminées est présente chez une faible population d'allergiques aux pollens de graminées. Enfin nous avons observé un cas clinique particulièrement intéressant (BOUSQUET et coll. [4]). Une femme présente périodiquement au printemps et en automne des lésions cutanées de vascularite allergique. Les tests cutanés réalisés sont positifs aux extraits de trèfle contaminé (β -glucosidase +) et négatifs aux extraits de trèfle non contaminés (β -glucosidase —). Bien que la signification exacte de ces tests ne soit pas encore totalement élucidée, il semble que la contamination de l'extrait soit responsable de la positivité du test.

Ainsi, le test réalisé, simple, pourrait permettre une analyse rapide et peu onéreuse de la contamination des extraits de pollens.

CONTROLE DU CONTENU ENZYMATIQUE D'UN EXTRAIT

Au moyen de la gamme Api-Zym, on a la possibilité d'obtenir très rapidement, avec une quantité très faible d'extrait (200 μ l d'un extrait au 1/10), une analyse du contenu enzymatique d'un extrait. Les enzymes sont des protéines fragiles dont l'activité disparaît sous l'action de divers facteurs dont la chaleur. Ainsi si on obtient un spectre enzymatique d'un extrait commercial juste après sa préparation on a un moyen simple pour contrôler son contenu enzymatique au cours du temps. Il est bien évident que la technique de caractérisation enzymatique est grossière et ne fait pas appel à la recherche ou/et au dosage des antigènes. Cependant, si une modification de l'activité enzymatique est notée, on peut en conclure que les caractéristiques de l'extrait sont différentes et que quelque chose s'est passé. Le test enzymatique pourrait donc avoir un rôle de dépistage malgré ses imprécisions.

CONCLUSIONS

Les dosages et caractérisations enzymatiques représentent une approche simple du contrôle des extraits polliniques destinés aux tests. Ils ont l'avantage d'être peu onéreux, reproductibles, de réalisation facile dans tout laboratoire et sont applicables à toutes les espèces de pollens. Mais ils ont aussi des inconvénients. En effet, il n'est pas clairement et définitivement établi chez l'homme que les enzymes sont des allergènes et les résultats que nous rapportons ici sont souvent fragmentaires et méritent une confirmation.

RÉFÉRENCES

1. ANDERSCH M. A., SZCYPINSKI A. J. — Use of q-nitrophenyl as a substrate in determination of serum acid phosphatase. *Am. J. clin. Pathol.*, 1947, 17, 571.
2. BOUSQUET J., GUÉRIN B., HEWITT B., MARTY J. P., MICHEL F. B. — Analysis of commercial pollen extracts by enzyme determination. Comparison of RAST Inhibition assay and enzyme titration for orchard grass, rye grass, and short ragweed extracts. *Ann. Allergy*, 1980, 45, 310-315.
3. BOUSQUET J., COUR P., MARTY J. P., MICHEL F. B. — Enzymes des pollens. *Rev. franç. Allergol.*, 1978, 18, 131.
4. BOUSQUET J., MEYNADIER J., BARNEON G., MEYNADIER J. — Clinical case : Cutaneous allergic vasculitis with immediate skin tests positive to plant matter (à paraître).
5. BOUSQUET J., MARTY F. P., COULOMB V., ROBINET-LEVY M., COUR P., MICHEL F. B. — A comparison of commercial pollen extracts. *Ann. Allergy*, 1978, 41, 164.
6. BOUSQUET J., MICHEL F. B. — Enzymes des pollens (à paraître).
7. GLEICH G. J., LERSON J. B., JONES R. T., BAER H. — Measurement of the potency of allergen extracts by their inhibitory capacities in the radio-allergo-sorbent test. *J. Allergy*, 1974, 53, 158.
8. GREENERT S., BERNSTEIN I. L., MICHAUD J. G. — Immune responses of non-atopic individuals to prolonged immunisation with ragweed extracts. *Lancet*, 1971, 2, 1121.
9. NAGEL W., WILLIG F., SCHMIDT F. H. — Über die aminosäure-arylamidase (sag lencin - amino-peptidase) aktivität in merscheilicher serum. *Klin. Wochenschr.*, 1964, 42, 447.